

УДК: 619.616:637.7

М.А. Златогурська

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
Шампанський провулок, 2, м. Одеса, 65068, Україна

ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Представники роду *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*) входять до складу природної мікрофлори рослин. Актуальним підходом у пошуках альтернативної заміни використанню ксенобіотиків у захисті та покращенні посівних якостей сільськогосподарських культур є вивчення природної мікробіоти рослин, виділення з них чистих культур, а також вивчення їх безпосередньої впливу на рослини. Ціллю даної роботи було виділення *L. plantarum* з виноградного сусла.

Для приготування сусла використовувався виноград сорту Лідія. Грона поміщали в стерильні склянки, дещо подрібнювали та закривали парафіноюю плівкою. Сусло витримували при кімнатній температурі. На третій день відбиралися зразки та у 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} розведеннях висівали на тверде поживне середовище MRS[1]. Після 1-3 днів культивування при 37°C в аеробних умовах відсіювали підозрілі колонії. Отримані колонії перевіряли на каталазну активність, забарвлювали за Грамом та мікроскопували.

З метою з'ясування видової належності виділених штамів використовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Хромосомальну ДНК бактеріальних клітин отримували методом теплового лізису культури [2]. ПЛР проводили з праймерами planF та pREV, що обмежують ділянку видоспецифічного для *L. plantarum* гену *recA*, довжиною 318 п.н. [3]. Реакційна суміш для проведення ПЛР містила: 7,8 мкл дейонізованої води; 2,0 мкл 10×ПЛР буфера; 2,0 мкл 2 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатів; 1,0 мкл 10 мМ праймеру planF; 1,0 мкл 10 мМ праймеру pREV; 0,4 мкл Taq-полімерази (5 Од/мкл); 0,8 мкл 50 мМ Mg^{2+} (усі реагенти фірми "Fermentas"); 5 мкл зразка надосадової рідини, що містить ДНК.

Ампліфікацію здійснювали у ампліфікаторі «Терцик», тому поверх реакційної суміші нашаровували мінеральне масло, з метою запобігання випаровування компонентів. Використовували наступні параметри ампліфікації: денатурація при 94°C за 60 сек, гібридизація при 55°C за 90 сек, елонгація при 72°C за 60 сек.

Електрофорез продуктів ПЛР здійснювали при 120 В впродовж 40 хвилин з використанням 1,5 % агарозного гелю та трисборатного буферу, що містив бромистий етидій. Результати знімали в ультрафіолетовому промінні з довжиною хвилі 214 нм. Електрофорез, а також врахування його

результатів здійснювали за допомогою обладнання «BioRad»

З виноградного суслу сорту Лідія було виділено 12 штамів бактерій. При фарбуванні за Грамом та мікроскопії вони виявилися грампозитивними мікроорганізмами паличкоподібної форми. Результати каталазного тесту свідчать про їх каталазонегативність. Ці ознаки є характерними для представників роду *Lactobacillus*.

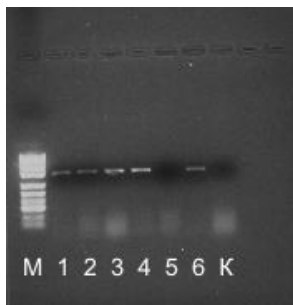


Рис. 1. Електрофореграма ПЛР продуктів ампліфікації гену *recA* виділених штамів *L. plantarum*. М – маркер молекулярної ваги; 1 - 6 – дослідні штами; К – контроль.

Електрофореграми ПЛР продуктів ампліфікації гену *recA* виділених штамів *L. plantarum* представлена на рис. 1 та 2. Дана нуклеотидна послідовність була характерна для 10 з 12 ізолятів.

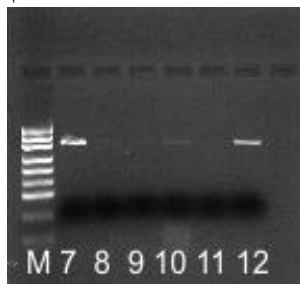


Рис. 2. Електрофореграма ПЛР продуктів ампліфікації гену *recA* виділених штамів *L. plantarum*. М – маркер молекулярної ваги, 7-12 – дослідні штами

В результаті досліджень було виділено 10 штамів *L. plantarum* з виноградного суслу сорту Лідія. Необхідними є подальше дослідження генетичної різноманітності популяції даного мікроорганізму, захисних якостей та впливу на біометричні та посівні якості насіння рослин.

Автор виражає подяку науковому керівникові – к.б.н., доценту Ліманській Наталії Вікторівні за керівництво та допомогу у виконанні даної роботи.

Література

1. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130 – 135.
2. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium //

Біологічні дослідження. – 2013: матеріали IV наук.-практич. всеукр. конф., 16-18 квітня 2013 р. – Житомир, 2013.

Vitis. – 2002. - Vol. 41, № 1. - P. 37 – 42.

3. Torriani S., Felis G., Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers// Applied and environmental microbiology. – 2001.- Vol. 67, № 8. - P. 3450–3454.